



ÖSTERREICHISCHES
PATENTAMT

52 Klasse: 30 F 014
51 Int.Cl.: A61K 035/16

AQ

19 AT PATENTSCHRIFT 11 Nr. 350 726

73 Patentinhaber: IMMUND AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCH-
MEDIZINISCHE PRODUKTE
WIEN ÖSTERREICH

54 Gegenstand: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER BLUT-
GERINNUNGSFÖRDERNDEN PRÄPERATION AUS
MENSCHLICHEM BLUTPLASMA

61 Zusatz zu Patent Nr.

62 Ausscheidung aus:

22 21 Angemeldet am: 1976 08 30, 6405/76

23 Ausstellungspriorität:

33 32 31 Unionspriorität:

42 Beginn der Patentdauer: 1978 11 15

Längste mögliche Dauer:

45 Ausgegeben am: 1979 06 11

72 Erfinder: EIBL JOHANN DR.
WIEN ÖSTERREICH
SCHWARZ OTTO DR.
WIEN ÖSTERREICH
ELSINGER FRITZ DR.
WIEN ÖSTERREICH

60 Abhängigkeit:

56 Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer blutgerinnungsfördernden Präparation aus menschlichem Blutplasma, welche eine neue blutgerinnungswirksame Substanz, genannt "FEIBA", enthält.

Diese Substanz beeinflusst in neuartiger Weise die Blutgerinnung und bewirkt eine Umgehung der Faktor VIII-Wirkung, was bedeutet, daß die Blutgerinnung ohne Faktor VIII-Zufuhr normalisiert wird. Die Präparation ist insbesondere zur Behandlung von Hämophilie A-Patienten mit Inhibitor geeignet. Die Abkürzung "FEIBA" steht für "Factor Eight Inhibitor-Bypassing Activity".

Die Hämophilie A ist eine seit langem bekannte Krankheit (Bluterkrankheit), bei der der Blutgerinnungsablauf durch das Fehlen der Aktivität eines Blutgerinnungsfaktors gestört ist. Dieser Faktor wird als anti-hämophiler Faktor (AHF) oder Faktor VIII bezeichnet. Eine Heilung dieser angeborenen, durch defekte Gene bedingten Krankheit als solche ist nicht möglich. Die Behandlung kann - im Falle einer Blutung - nur durch intravenöse Zufuhr entsprechender Mengen an Faktor VIII, welcher aus dem Blut gesunder Spender stammte, erfolgen. Während man früher auf Vollblut bzw. Vollplasma angewiesen war, von denen große Mengen appliziert werden mußten, gibt es heute Präparate, die den Faktor VIII in konzentrierter und auch stabiler, gefriergetrockneter Form enthalten. Die Behandlung mit diesen Präparaten führt in den meisten Fällen zu einer raschen Blutstillung.

Es gibt jedoch auch Patienten, bei denen nicht nur ein Fehlen der Faktor VIII-Aktivität vorliegt, sondern die auch einen gegen Faktor VIII gerichteten Hemmstoff (Inhibitor) besitzen, der - je nach vorhandener Menge - die Wirkung von zugeführtem Faktor VIII durch Neutralisation (Inhibition) zunichte macht. Bei diesen Faktor VIII-Inhibitor-Patienten gab es bisher wenig Aussicht auf eine erfolgreiche Behandlung. Die einzige Möglichkeit bestand in der Entfernung des Inhibitors vor der Behandlung mit Faktor VIII-Konzentraten, was nur durch Plasmaaustausch des Patientenplasmas gegen Plasma eines gesunden Spenders oder gegen Plasmaersatzmittel möglich ist; dies erfordert einen großen technischen und medizinischen Aufwand. Der Plasmaaustausch muß vor neuerlicher Behandlung wiederholt werden, da der Inhibitor - speziell nach Zufuhr von neuem Faktor VIII als Antigen durch "Boostereffekt" - sich wieder nachbildet. Eine Behandlung der Inhibitorpatienten mit sogenannten "Immunsuppressiva" zur Unterdrückung der in vivo-Synthese des Inhibitors ist bisher meistens erfolglos verlaufen.

Seit kurzem zeichnet sich eine neue Möglichkeit zur Behandlung von Faktor VIII-Inhibitor-Patienten ab. Kurczynski und Penner, New Engl. J. Med., Bd. 291, Seiten 164 bis 167, 1974, berichteten als erste über eine erfolgreiche Behandlung von Faktor VIII-Inhibitor-Patienten mit sogenannten "aktivierten" Prothrombinkomplex-Konzentraten. Auch in Publikationen von Sultan, Brouet und Debre, New Engl. J. Med., Bd. 291, Seite 1087, 1974, und Abildgaard, Britton und Roberts, Blood, Bd. 44, Seite 933, 1974, wird über klinisch erfolgreiche Anwendungen von aktivierten Prothrombinkomplex-Präparaten bei blutenden Faktor VIII-Inhibitor-Patienten berichtet.

Die sogenannte Aktivierung dieser Prothrombinkomplex-Konzentrate ist wahrscheinlich auf unbekannte Verunreinigungen zurückzuführen. Die Präparate konnten bezüglich ihres wirksamen Prinzips nicht getestet und nicht standardisiert werden. Die Ergebnisse sind daher unsicher und kaum wiederholbar.

Die Erfindung bezweckt die Überwindung der geschilderten Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, eine Präparation zu schaffen, die in wiederholbarer und gezielter Weise eine Generierung der gewünschten Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität gewährleistet. Die Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität soll mit Hilfe eines geeigneten Testsystems meßbar und standardisierbar sein. Die Präparation soll klinisch wirksam und verträglich sein, d.h. bei blutenden Faktor VIII-Inhibitor-Patienten zu einer Blutstillung führen und keine unerwünschten Nebenwirkungen zeigen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß menschliches Zitrat-Ionen enthaltendes Plasma in Abwesenheit von freien Calciumionen mit wasserunlöslichen anorganischen gerinnungsphysiologisch-oberflächenaktiven Stoffen, wie Kieselgel oder Kaolin, behandelt wird, wobei die neue Substanz generiert wird, anschließend die wasserunlöslichen Stoffe abgeschieden werden und dann der Überstand in an sich bekannter Weise mit basischen Ionenaustauschern, wie Diäthylaminoäthyl-Gruppen haltigen hochmolekularen Stoffen, behandelt wird, wobei die Substanz FEIBA zusammen mit den Faktoren II-VII-IX-X daran adsorbiert wird, worauf diese eluiert und konzentriert werden. Die neue Substanz mit der FEIB-Aktivität ist ein Protein mit einem höheren Molekulargewicht als jenes der nicht aktivierten Faktoren II, VII, IX, X (Prothrombinkomplex). Während letztere Faktoren ein Molekulargewicht von etwa 70000 aufweisen, hat die neue Substanz ein Molekulargewicht im Bereich von etwa 100000.

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der neuen Präparation wird menschliches Zitratplasma verwendet, welches alle Gerinnungsfaktoren in nativer Form enthält; ferner können auch Plasmafraktionen verwendet werden, die nach Abtrennung des Faktor VIII (AHF) anfallen, wie z.B. ein Plasmaüberstand von Kryopräzipitat oder von Präzipitat I nach Cohn.

Vorteilhaft erfolgt die Generierung der Substanz FEIBA unter Einhaltung eines pH-Bereiches von 5,5 bis 8,5 und einer Temperatur von 0 bis 30°C.

Zweckmäßig werden hier bei der wasserunlöslichen anorganischen gerinnungsphysiologisch-oberflächen-

aktiven Stoff in in r Menge von 0,05 bis 5%, vorzugsweise 0,1 bis 1%, bezogen auf die Menge des Plasmas, verwendet.

Zur Behandlung des Plasmas können Stoffe eingesetzt werden, die zum Großteil aus feinteiligem Siliciumdioxid bestehen, z.B. Stoffe aus der Gruppe der Diatomeen, wie C lit, oder Stoffe, die aus Siliciumdioxid und Aluminiumdioxid zusammengesetzt sind, z.B. Kaolin. Allgemein sind Stoffe geeignet, die als "oberflächenaktiv" im Gerinnungssystem bekannt sind bzw. die durch ihre Oberflächenaktivität in der Lage sind, die Kontaktphase der Blutgerinnung einzuleiten. Während die durch diese Stoffe oberflächenaktivierbaren Gerinnungsfaktoren (Faktoren XI und XII) in ihrer aktivierten Form in dieser Stufe adsorbiert werden, bleiben die Faktoren II, VII, IX, X zusammen mit der generierten Substanz FEIBA im Überstand und können nach Abtrennung der oberflächenaktiven, wasserunlöslichen Stoffe unter Anwendung bekannter Methoden abgetrennt bzw. angereichert werden. Für letzteren Schritt können z.B. schwach basische Ionenaustauscher verwendet werden; Diäthylaminoäthyl (DEAE)-Gruppen haltige, hochmolekulare Stoffe, z.B. DEAE gebunden an Cellulose oder quervernetzte Dextrane, haben sich besonders bewährt. Durch Adsorption an die erwähnten Ionenaustauscher, Waschung und Elution der adsorbierten Plasmaproteine mit erhöhter Ionenstärke kann die Proteinfraction, welche die FEIB-Aktivität nun in gereinigter und angereicherter Form enthält, isoliert werden. Nach Entfernung der Salze durch Dialyse und anschließende Gefriertrocknung erhält man die rohe, die FEIB-Aktivität enthaltende Fraction in trockener, stabiler Form. Aus dieser entsteht das fertige Präparat durch Wiederauflösung in Wasser, Zusatz von Salzen, pH-Einstellung, Sterilfiltration und neuerliche Gefriertrocknung.

Untersuchungen über die Eigenschaften der erfindungsgemäß hergestellten Präparationen brachten den Beweis, daß für die FEIB-Aktivität die Faktoren IIa (Thrombin) und Xa nichts beitragen. Thrombin in Spuren, wie es in der erfindungsgemäß hergestellten Präparation enthalten sein kann, ergibt keine Verkürzung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit von Faktor VIII-Inhibitorplasma. Auch Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor - ein bekannter Inhibitor von Faktor Xa-Aktivität - hemmt die FEIB-Aktivität der Präparation nicht. Auf Grund von gelchromatographischen Untersuchungen hat sich ergeben, daß die neue Substanz ein höheres Molekulargewicht aufweist als die bekannten Faktoren des Prothrombinkomplexes II, VII, IX und X. Da ferner die aktivierten Faktoren des Prothrombinkomplexes durch enzymatische Abspaltung eines Bruchstückes des entsprechenden nativen (nicht aktivierten) Gerinnungsfaktors entstehen, somit kleinere Moleküle entstehen als die Moleküle der entsprechenden nicht aktivierten Faktoren, ist mit Sicherheit anzunehmen, daß die FEIB-Aktivität in den erfindungsgemäß hergestellten Präparationen nicht durch einen aktivierten Faktor des Prothrombinkomplexes bewirkt wird, sondern eben durch die neu generierte Substanz mit höherem Molekulargewicht.

Zur Kennzeichnung der neuen Substanz kann einerseits das Verhältnis der Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X zur FEIB-Aktivität herangezogen werden: Dieses Verhältnis, ausgedrückt in Einheiten, liegt zwischen 0,1 und 10, vorzugsweise zwischen 0,5 und 2, wobei eine Einheit Faktor II-VII-IX-X der Aktivität dieser Faktoren entspricht, die durchschnittlich in 1 ml frischem menschlichem Zitratplasma enthalten ist, und eine FEIBA-Einheit als jene FEIB-Aktivität definiert ist, welche die aktivierte partielle Thromboplastinzeit eines hochtitrigen Faktor VIII-Inhibitorplasmas auf die Hälfte des Leerwertes verkürzt. Andererseits kann zur Kennzeichnung der neuen Substanz auch ihre amidolytische Aktivität herangezogen werden. Unter amidolytischer Aktivität versteht man die Fähigkeit einer Substanz, in standardisierten Peptidverbindungen, die über eine Amidbindung mit dem Chromophor p-Nitroanilin verbunden sind, das p-Nitroanilin abzuspalten, welches photometrisch bestimmt wird. Solche standardisierten Peptidpräparate werden z.B. von der Firma KABI in Schweden hergestellt; so sind das Peptid S-2160 N-Benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginin-p-nitroanilid.HCl (Kurzform: Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid.HCl) für Thrombinspezifisch, S-2222 N-Benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-glycyl-L-arginyl-p-nitroanilid.HCl (Kurzform: Bz-Hé-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilid.HCl) für Xa und S-2251 D-Valyl-L-leucyl-L-lysyl-p-nitroanilid.2HCl (Kurzform: D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilid.2HCl) für Plasmin.

Testet man die erfindungsgemäß hergestellte Präparation gegenüber den genannten Substraten, so findet man eine vernachlässigbare geringe amidolytische Aktivität. Andererseits würde ein Test eines Präparates mit einem Gehalt von Thrombin und/oder Faktor Xa, wenn man diese auf die gleiche FEIB-Aktivität einstellt, die die erfindungsgemäß hergestellte Präparation zeigt, eine hohe amidolytische Aktivität zeigen.

Ein weiteres Merkmal der erfindungsgemäßen Präparation ist auch darin zusehen, daß sie, wenn überhaupt, nur eine geringe Thrombinaktivität besitzt. Das Verhältnis der Thrombinaktivität zur FEIB-Aktivität übersteigt 0,02 nicht, wobei die Thrombin-Aktivität in NIH-Einheiten (NIH = US-National Institute of Health) und die FEIB-Aktivität in FEIB-Einheiten ausgedrückt ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die Eigenschaften der danach hergestellten Präparationen sind in den folgenden Beispielen und Testergebnissen näher erläutert:

Beispiel 1: Frisch gefrorenes Plasma wird bei 0 bis +40°C aufgetaut und das dabei anfallende Kryopräzipitat durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Kryouberstand wird mit 0,5 n Salzsäure auf pH 7,0

gestellt, mit 5 g Kaolin pro 1 l Kryüberstand versetzt und bei +4°C 1 h gerührt. Hierauf wird Kaolin durch Zentrifugieren abgetrennt. Die generierte Substanz FEIBA wird nun - zusammen mit den Faktoren des Prothrombinkomplexes - an DEAE-Sephadex adsorbiert.

Zu diesem Zwecke werden 0,5 g DEAE-Sephadex A-50 pro 1 l Kaolinüberstand zugesetzt und eine 1/2 h bei +4°C gerührt. Das DEAE-Sephadex wird abgetrennt; das überstehende Plasma kann zur Gewinnung von Gamma-Globulin und Albumin verwendet werden; DEAE-Sephadex wird einem 2fachen Waschprozeß mit einer Trinatriumcitrat-Natriumchlorid-Lösung unterworfen, wobei ein pH-Wert von 7,5 eingehalten wird.

Zur Elution wird das DEAE-Sephadex mit 3% Natriumchlorid, 0,1% Trinatriumcitrat. 2H₂O (2% des ursprünglichen Plasmavolumens) 20 min gerührt und durch Filtration des Eluat gewonnen. Dieses wird über Nacht gegen 0,05% Trinatriumcitrat. 2H₂O, 0,1% Natriumchlorid-Lösung bei pH 7,0 bis +4°C dialysiert, hierauf eingefroren und einem ersten Lyophilisationsvorgang unterworfen (bulk). Im bulk-Material wird die FEIB-Aktivität sowie die Aktivität der Faktoren des Prothrombinkomplexes bestimmt.

Für die Herstellung der pharmazeutisch anwendbaren Präparation mit FEIB-Aktivität soll das Verhältnis Einheiten Faktor II-VII-IX-X zu FEIBA-Einheiten zwischen 0,5 und 2 liegen; dies kann durch Mischung geeigneter bulk-Chargen erfolgen. Das bulk-Material wird mit destilliertem, pyrogenfreiem Wasser gelöst, so daß die FEIB-Aktivität zwischen 10 und 50 FEIBA-Einheiten pro ml beträgt (vorliegendenfalls 25 FEIBA-Einheiten pro ml). Nach Zusatz der nötigen Salze zur Herstellung der Isotonie und Einstellung des pH zwischen 7,0 und 7,5 wird die Lösung durch Membranfilter geklärt und zuletzt durch ein 0,2 µm Membranfilter steriltfiltriert. Die Lösung wird unter sterilen Bedingungen zu 20 ml in die Endbehälter verfüllt, tiefgefroren und lyophilisiert.

Beispiel 2: Als Ausgangsmaterial dient wieder frisch gefrorenes Plasma bzw. der daraus resultierende Kryüberstand. Dem Kryüberstand werden ohne pH-Stellung (nativer pH = 7,8) 10 g Cellit 512 g pro 1 l Kryüberstand zugesetzt und 3 h bei +4°C gerührt. Nach Abtrennung des Cellits durch Zentrifugation wird die Aufarbeitung der Präparation mit der generierten Substanz FEIBA in gleicher Weise vorgenommen wie in Beispiel 1.

An den fertigen Präparationen wurden neben den üblichen Sicherheitstests auf Sterilität, Unschädlichkeit, Pyrogenfreiheit, Abwesenheit von HBs-Antigen Tests auf Wirksamkeit (FEIB-Aktivität), Gehalt an Prothrombinkomplex-Faktoren, Thrombingehalt sowie die amidolytische Aktivität mit den 3 Substraten S-2160, S-2222 und S-2251 durchgeführt.

Die vorgenommenen Tests wurden in nachfolgend beschriebener Weise durchgeführt.

1. Wirksamkeitstest (Bestimmung der FEIBA-Einheiten).

a) Reagenzien:

Faktor VIII-Inhibitorplasma:

Zitratplasma eines Patienten mit Haemophilie A mit einem Inhibitor gegen Faktor VIII (Inhibitor-titer mindestens 10 Einheiten pro ml), lyophilisiert. Während der Testperiode wird das Inhibitorplasma ins Eisbad gestellt.

Phosphorlipid-Kaolin-Suspension:

Das Phosphorlipid-Konzentrat (Tachostyptan, Hormon Chemie München) wird 1 : 200 im Owrens Puffer verdünnt und mit 0,5% Kaolin G/V (0,5 g pro 100 ml) versetzt. Das Gemisch wird tiefgefroren gelagert. Während der Testperiode wird es bei Raumtemperatur gehalten.

Zitrat-/Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel für Proben.

0,7% Natriumchlorid/0,7% Natriumzitrat. 2H₂O m/20 Kalziumchlorid:

Während der Testperiode wird es bei 37°C gehalten.

b) Testmethode:

Nach Auflösung der zu untersuchenden Fraktion FEIBA Probe und eines FEIBA Standardpräparates mit definierten FEIBA-Einheiten pro ml in der angegebenen Menge destillierten Wassers, werden unter Verwendung von Zitrat-/Kochsalzlösung 6 geometrische Verdünnungen hergestellt, wobei man mit 5 FEIBA-Einheiten pro ml beginnt. Diese Verdünnungen werden während der Testperiode in einem Eisbad gehalten. Die Reagenzien werden auf folgende Weise in Glasröhrchen pipettiert:

0,05 ml Faktor VIII-Inhibitorplasma

0,05 ml Probe (Verdünnungen der Testproben und des Standards, sowie auch Zitrat-/Kochsalzlösung als Leerwert)

0,05 ml Phosphorlipid Kaolin Suspension
6 min bei 37°C inkubieren

0,05 ml m/20 Kalziumchlorid

Die Zeit von der Kalziumchloridzugabe bis zur Gerinnungsbildung wird mit einer Stoppuhr gemessen (Kippen der Teströhrchen oder Anwendung eines automatischen Koagulometers).

c) Berechnung der FEIBA-Einheiten pro Flasche:

Es wird eine Eichkurve erstellt, indem man die Gerinnungszeiten (in Sekunden) der Verdünnungen des FEIBA-Standard-Präparates gegen die entsprechenden Konzentrationen (in FEIBA-Einheiten pro ml) auf doppelt logarithmisches Millimeterpapier aufträgt. Die FEIBA-Aktivitäten der Testprobenverdünnungen werden unter Verwendung der Eichkurve und durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor errechnet. Der Mittelwert dieser Ergebnisse entspricht der FEIBA-Aktivität der Testprobe, ausgedrückt in FEIBA-Einheiten pro ml. Multipliziert man diesen Wert mit dem Lösungsvolumen (in ml), dann erhält man die Gesamtmenge der FEIBA-Einheiten pro Flasche.

2. Bestimmung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X.

A) Faktor II-Bestimmung:

a) Reagenzien:

Serum: Blut eines gesunden Spenders (ohne Antikoagulans) wird 24 h bei 37°C inkubiert. Vom geronnenen Blut wird das Serum entfernt, zentrifugiert, in Portionen aufgeteilt und tiefgefroren aufbewahrt.

Rinderoxalatplasma mit Bariumsulfat absorbiert (als Quelle für Faktor V und als Verdünnungsmittel für Proben): Neun Teile Rinderblut werden mit einem Teil 1,34%igen Natriumoxalat vermischt. Das sich ergebende Plasma wird mit 10% Bariumsulfat absorbiert. Nach der Zentrifugierung wird das absorbierte Plasma in Portionen abgefüllt und tiefgekühlt aufbewahrt.

"Thromborel" (kalziumhaltiges, menschliches Thromboplastin) Behringwerke AG, Marburg-Lahn.

b) Testmethode:

Die Reagenzien (sie werden mit Ausnahme von Thromborel während des Testvorganges in einem Eisbad aufbewahrt), werden auf folgende Weise in Glasröhrchen pipettiert:

0,05 ml Serum

0,05 ml Probe (Reihenverdünnungen der zu testenden Probe bzw. eines "normalen Plasmas" oder eines Standards)

1 min bei 37°C inkubieren

0,2 ml Thromborel (ist während des Testvorganges auf 37°C zu halten)

Die Zeit ab der Zugabe von Thromborel bis zur Gerinnungsbildung wird mit einer Stoppuhr gemessen.

c) Berechnung der Faktor II-Konzentration:

Aus gepoolten Plasmaproben von mindestens 15 gesunden Spendern wird ein Standardplasma hergestellt. Dieses "Poolplasma" gilt als "normales Plasma" und seine Faktor II-Aktivität wird mit 100% angenommen. Nun wird eine Eichkurve erstellt, indem man die Gerinnungszeiten der Plasmareihenverdünnungen dieses gepoolten Plasmas (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, ...) gegen die entsprechenden Konzentrationen auf doppelt logarithmisches Millimeterpapier aufträgt. Die Faktor II-Konzentrationen der Testprobenverdünnungen werden unter Verwendung der Eichkurve in Prozent des normalen Plasmas ausgedrückt und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Der Durchschnittswert dieser Ergebnisse entspricht der Aktivität des Testmaterials in Prozent des Faktors II. Die Menge des in einer Flasche vorhandenen Faktors II wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Einheiten Faktor II} = \frac{(\% \text{ Faktor II-Konzentration}) \times (\text{Volumen in ml})}{100}$$

Eine Einheit Faktor II ist äquivalent zu jener Faktor II-Aktivität, die durchschnittlich in 1 ml frischem Zitratplasma vorhanden ist.

B) Faktor VII-Bestimmung

a) Reagenzien:

Faktor VII-Mangelplasma: Zitratplasma eines Patienten mit schwerem Faktor VII-Mangel (Faktor VII unter 1%), in tiefgefrorenem Zustand gelagert oder nach Zugabe von 1% Gewicht/Volumen HEPES lyophilisiert, mit einem pH-Wert von 7,0.

Zitrierte Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel der Proben: 0,7% Trinatriumzitrat. $2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,7% Natriumchlorid.

"Thromborel" (Kalziumhaltiges humanes Thromboplastin) der Behring-Werke AG, Marburg/Lahn.

b) Testmethode:

Das Mangelplasma und die Verdünnungen der Probe werden im Eisbad aufbewahrt. "Thromborel" wird während der Untersuchung bei 37°C gelagert.

Die Reagenzien werden auf folgende Weise in Glasröhrchen pipettiert:

0,05 ml Faktor VII-Mangelplasma

0,05 ml Probe (Reihenverdünnungen der zu testenden Probe, bzw. eines "normalen Plasmas" oder eines Standards)

1 min inkubieren bei 37°C

0,2 ml "Thromborel"

Die Zeit von der "Thromborel"-Zugabe bis zur Gerinnselbildung wird mit einer Stoppuhr gemessen.

c) Berechnung der Faktor VII-Konzentration:

Die Berechnung der Faktor VII-Konzentration erfolgt in gleicher Weise wie für Faktor II beschrieben.

C) Faktor IX-Bestimmung:

a) Reagenzien:

Faktor IX-Mangelplasma: Zitratplasma eines Patienten mit schwerer Hämophilie B (Faktor IX unter 1%), in tiefgefrorenem Zustand gelagert.

Phospholipid/Kaolin-Suspension: Phospholipid-Konzentrat (Tachostyptan, Hormon Chemie München) wird 1 : 200 in Owren's Puffer verdünnt, mit Kaolin versetzt (0,5 g per 100 ml) und tiefgekühlt gelagert. Rinderoxalatplasma, mit Bariumsulfat absorbiert, als Verdünnungsmittel für Proben: 9 Teile Rinderblut werden mit einem Teil 1,34%igen Natriumoxalat vermischt. Das sich ergebende Plasma wird mit 10% Bariumsulfat absorbiert. Nach dem Zentrifugieren wird das absorbierte Plasma in Portionen abgefüllt und tiefgefroren aufbewahrt. m/20 Kalziumchlorid

b) Testmethode:

Inkubation von Faktor IX-Mangelplasma mit Phospholipid/Kaolin-Suspension: Die erforderliche Menge von Mangelplasma wird mit einem gleichen Volumen von Phospholipid/Kaolin-Suspension vermischt, 5 min bei 37°C inkubiert und dann 30 min in einem Eisbad gelagert.

Die Reagenzien (sie werden mit Ausnahme von Kalziumchlorid während des Testvorganges in einem Eisbad aufbewahrt), werden auf folgende Weise in Glasröhrchen pipettiert:

0,2 ml inkubierte Mangelplasma-Phospholipid/Kaolin-Suspension

0,1 ml Probe (Reihenverdünnungen der zu testenden Probe bzw. eines "normalen Plasmas" oder eines Standards)

1 min bei 37°C inkubieren

0,1 ml m/20 Kalziumchlorid (ist während des
T stvorganges bei 37°C zu halten)

Die Zeit ab der Zugabe von Kalziumchlorid bis zur Gerinnselbildung wird mit einer Stoppuhr gemessen.

c) Berechnung der Faktor IX-Konzentration:

Die Berechnung der Faktor IX-Konzentration erfolgt in gleicher Weise wie für Faktor II beschrieben.

D) Faktor X-Bestimmung:

a) Reagenzien:

Faktor X-Mangelplasma: Zitratplasma von einem Patienten mit schwerem Faktor X-Mangel (Faktor X unter 1%) wird tiefgekühlt gelagert oder nach Hinzufügung von 1% HEPES und Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 lyophilisiert.

Zitrat-Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel für Proben: 0,7% Natriumchlorid/0,7% Natriumzitrat. 2 H₂O

"Thromborel" (kalziumhaltiges, menschliches Thromboplastin), Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

b) Testverfahren:

Die Reagenzien (sie werden mit Ausnahme von Thromborel während des Testvorganges in einem Eisbad aufbewahrt), werden auf folgende Weise in Glasröhrchen pipettiert:

0,05 ml Faktor X-Mangelplasma

0,05 ml Probe (Reihenverdünnungen der zu testenden Probe bzw. des "normalen Plasmas" oder eines Standards)
1 min bei 37°C inkubieren

0,2 ml Thromborel (ist während des Testvorganges auf 37°C zu halten).

Die Zeit ab der Zugabe von Thromborel bis zur Gerinnselbildung wird mit einer Stoppuhr gemessen.

c) Berechnung einer Faktor X-Konzentration:

Die Berechnung der Faktor X-Konzentration erfolgt in gleicher Weise wie für Faktor II beschrieben.

3. Thrombintest

a) Reagenzien:

1%ige Fibrinogenlösung menschlichen Ursprungs
Standardisiertes Thrombin (Topostasin, Roche,
3000 NIH-Thrombin-Einheiten pro Flasche)

0,7% Natriumchlorid/0,7% Natriumzitrat . 2 H₂O
als Verdünnungsmittel (Zitrat-/Kochsalzlösung).

b) Testmethode:

Nach Auflösung des lyophilisierten Produktes in der angegebenen Menge destillierten Wassers werden sechs geometrische Verdünnungen unter Verwendung von Zitrat-/Kochsalzlösung und acht geometrische Verdünnungen vom standardisierten Thrombin hergestellt, wobei man mit 1 NIH-Einheiten per ml beginnt.

Testverfahren:

0,2 ml 1%ige Fibrinogenlösung und

0,2 ml Probe (Fraktion FEIBA- und Thrombinverdünnungen, sowie auch ein Leerwert mit Zitrat-/Kochsalzlösung)

wird bei 37°C inkubiert. Die Zeit bis zur Gerinnselbildung wird durch Klappen der Teströhr-

chen in immer größer werdenden Zeitabständen, u. zw. von 10 min bis zu 1 h, gemessen. Dieser Vorgang erstreckt sich auf mindestens 6 h. Ein letztes Kippen des Röhrchens erfolgt nach der Inkubation über Nacht. Der Leerwert (Verdünnungsmittel als Probe) muß über Nacht stabil bleiben (keine Gerinnselbildung).

5 c) Berechnung der Thrombin-Konzentration:

Es wird eine Eichkurve erstellt, indem man die Gerinnungszeiten der geometrischen Verdünnungen des Standardthrombins gegen die entsprechende Konzentration (Thrombineinheiten pro ml) auf doppelt logarithmisches Millimeterpapier aufträgt. Die Thrombin-Konzentrationen der Testprobenverdünnungen werden unter Verwendung der Eichkurve und durch Multiplikation mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor errechnet. Der Mittelwert dieser Ergebnisse entspricht der Thrombin-Aktivität der Testprobe, ausgedrückt in Thrombineinheiten pro ml. Multipliziert man diesen Wert mit dem Lösungsvolumen in ml, so erhält man die Gesamtmenge der Thrombin-Einheiten pro Flasche.

10 4. Bestimmung der amidolytischen Aktivität

15 a) Reagenzien:

Chromogene Substrate:

20 S-2160: N-Benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginin-p-nitroanilid . HCl
(Kurzform: Bz-Phe-Val-Arg-p-nitroanilid.HCl)

0,5 mg/ml H₂O = 0,73 m molar

25 S-2222: N-Benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-L-glycyl-L-arginyl-p-nitroanilid . HCl
(Kurzform: Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilid . HCl)

1,4 mg/ml H₂O = 1,91 m molar

30 S-2251: D-Valyl-L-leucyl-L-lysyl-p-nitroanilid . 2 HCl
(Kurzform: D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilid . 2 HCl)

1,65 mg/ml H₂O = 2,99 m molar

Puffer:

35 6,06 g "Tris" [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]
= 0,05 molar

10,6 g Natriumchlorid = 0,18 molar

Mit 1 l dest. Wasser lösen. Der pH-Wert wird mit konzentrierter Salzsäure auf 7,4 eingestellt.

b) Testverfahren:

40 1,0 ml Puffer
0,1 ml Testprobe (Präparation enthaltend FEIBA)
0,2 ml Substrat (S-2160 bzw. S-2222 bzw. S-2251)

45 Dieses Gemisch wird in eine auf 37°C temperierbare Küvette (Schichtdicke 1 cm) gefüllt und in einem Photometer bei 405 nm die Zunahme der optischen Dichte in Zeitintervallen von 1 min gemessen.

c) Auswertung:

Aus mindestens 5 Einzelmessungen wird die durchschnittliche Zunahme der optischen Dichte pro Minute berechnet und mit 1000 multipliziert; dieser Wert wird mit $\Delta OD \cdot 10^3 / \text{min}$ bezeichnet und dient zur Charakterisierung der amidolytischen Aktivität (Enzymaktivität) der untersuchten Probe in bezug auf das jeweils eingesetzte Substrat.

Dividiert man nun die gemessenen $\Delta OD \cdot 10^3/\text{min}$ -Werte durch die Aktivität der Testprobe in FEIBA-Einheiten pro 0,1 ml (eingesetzte Probenmenge) bzw. in Faktor II, VII, IX, X-Einheiten pro 0,1 ml, so ergibt sich eine für die jeweilige Testprobe - unter den erwähnten Testbedingungen - charakteristische "spezifische amidolytische Aktivität", d.h. der auf 1 Einheit FEIBA bzw. 1 Einheit Faktor II, VII, IX, X bezogene $\Delta OD \cdot 10^3/\text{min}$ -Wert.

Die nach den Beispielen 1 und 2 hergestellten Präparationen zeigten bei den in der beschriebenen Weise durchgeführten Tests die in der Tabelle angegebenen Eigenschaften.

Tabelle

	Beispiel 1	Beispiel 2
Abfüll- bzw. Auflösungsvolumen	20 ml	20 ml
FEIBA-Einheiten pro Flasche	470	280
Faktor II-Einheiten pro Flasche	610 (1,30)	240 (0,86)
Faktor VII-Einheiten pro Flasche	520 (1,11)	260 (0,93)
Faktor IX-Einheiten pro Flasche	700 (1,49)	300 (1,07)
Faktor X-Einheiten pro Flasche	540 (1,15)	210 (0,75)
Thrombin NIH-Einheiten pro Flasche	1,4 (0,003)	1,0 (0,004)
Amidolytische Aktivitäten ($\Delta OD \cdot 10^3/\text{min}$)		
S-2160	1 (0,43)	1 (0,71)
S-2222	3 (1,28)	2,5 (1,79)
S-2251	4 (1,70)	2 (1,43)

Die Zahlen in Klammer geben das jeweilige Verhältnis zu den FEIBA-Einheiten an. Bei den amidolytischen Aktivitäten ist die Zahl in Klammer die "spezifische amidolytische Aktivität", d.h. der jeweilige $\Delta OD \cdot 10^3/\text{min}$ -Wert pro eine im beschriebenen Testsystem eingesetzte FEIBA-Einheit.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung einer blutgerinnungsfördernden Präparation aus menschlichem Blutplasma, welche eine neue blutgerinnungswirksame Substanz, genannt "FEIBA", enthält, dadurch gekennzeichnet, daß menschliches, Zitrat-Ionen enthaltendes Plasma in Abwesenheit von freien Kalziumionen mit wasserunlöslichen anorganischen gerinnungsphysiologisch-oberflächenaktiven Stoffen, wie Kieselgel oder Kaolin, behandelt wird, wobei die neue Substanz generiert wird, anschließend die wasserunlöslichen Stoffe abgeschieden werden und dann der Überstand in an sich bekannter Weise mit basischen Ionenaustauschern, wie Diäthylaminoäthyl-Gruppen haltigen hochmolekularen Stoffen, behandelt wird, wobei die Substanz FEIBA zusammen mit den Faktoren II-VII-IX-X daran adsorbiert wird, worauf diese eluiert und konzentriert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Generierung der Substanz FEIBA unter Einhaltung eines pH-Bereiches von 5,5 bis 8,5 und einer Temperatur von 0 bis 30°C erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die wasserunlöslichen anorganischen gerinnungsphysiologisch-oberflächenaktiven Stoffe in einer Menge von 0,05 bis 5%, vorzugsweise 0,1 bis 1%, bezogen auf die Menge des Plasmas, verwendet werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)